

File 351:Derwent WPI 1963-2003/UD,UM &UP=200361  
(c) 2003 Thomson Derwent

2/3,AB/1

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI  
(c) 2003 Thomson Derwent. All rts. reserv.

007873772

WPI Acc No: 1989-138884/198919

Related WPI Acc No: 1991-208167

XRAM Acc No: C89-061361

XPX Acc No: N89-106080

**Magnetic particles for immunoassays and biomedical processes - contg.  
polymer core coated with mixt. of magnetically reacting metal oxide and  
polymer**

Patent Assignee: DADE INT INC (DADE-N); BAXTER INT INC (BAXT ); BAXTER  
DIAGNOSTICS INC (BAXT )

Inventor: SHAH D O; WANG C J; WANG C H J; WANG C

Number of Countries: 015 Number of Patents: 013

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
DE 3836475	A	19890503	DE 3836475	A	19881026	198919 B
WO 8904373	A	19890518	WO 88US3666	A	19881018	198922
AU 8927966	A	19890601				198934
EP 344270	A	19891206	EP 89900419	A	19881018	198949
JP 2501753	W	19900614	JP 89500503	A	19881018	199030
US 5091206	A	19920225	US 89337511	A	19890530	199211
DE 3836475	C2	19940526	DE 3836475	A	19881026	199419
EP 344270	B1	19941130	WO 88US3666	A	19881018	199501
			EP 89900419	A	19881018	
DE 3852299	G	19950112	DE 3852299	A	19881018	199507
			WO 88US3666	A	19881018	
			EP 89900419	A	19881018	
EP 344270	A4	19921209	EP 89900419	A	19890000	199524
CA 1339053	C	19970729	CA 581132	A	19881025	199742
CA 1339545	C	19971118	CA 581132	A	19881025	199807
			CA 617030	A	19951019	
JP 2736467	B2	19980402	WO 88US3666	A	19881018	199818
			JP 89500503	A	19881018	

Priority Applications (No Type Date): US 87113294 A 19871026; US 89337511 A  
19890530

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
DE 3836475	A		20		
WO 8904373	A	E			
					Designated States (National): AU JP
					Designated States (Regional): AT BE CH DE FR GB IT LU
EP 344270	A	E			
					Designated States (Regional): BE CH DE FR GB IT LI NL SE
US 5091206	A		12		
DE 3836475	C2		17	H01F-001/113	
EP 344270	B1	E	27	C12Q-001/68	Based on patent WO 8904373
					Designated States (Regional): BE CH DE FR GB IT LI NL SE
DE 3852299	G			C12Q-001/68	Based on patent EP 344270
					Based on patent WO 8904373
CA 1339545	C			C12N-015/10	Div ex application CA 581132

JP 2736467    B2    13 C08F-012/08    Previous Publ. patent JP 2501753  
Based on patent WO 8904373  
CA 1339053    C    H01F-001/28

Abstract (Basic): DE 3836475 A

(A) Magnetic particles contg. polymer particles forming an inner core and a magnetically reacting metal oxide/polymer coating uniformly covering the inner core are new. (B) Also new are magnetic particles as defined above which additionally contain either (1) an outer polymer layer uniformly covering the metal oxide/polymer coating and a layer of a functionalised polymer covering the outer polymer layer or (2) a layer of a functionalised polymer covering the coating. Procedure for the determ. of the presence or concn. of an analyte, where magnetic particles (B) carrying, bound to the functionalised polymer, ligands which are specific for the analyte are contacted with a liq. specimen to form a suspension; (2) the suspension is incubated, the magnetic particles are sepd. from the suspension; particles are treated with a second, labelled ligand which is specific for the analyte; suspension is incubated until a sufficient amt. of the analyte has reacted with the labelled ligand; magnetic particles are sepd. from the suspension; amt. of the labelled ligand associated with the magnetic particles is measured; and a relation is established between the measured amt. of labelled ligand and the amt. of analyte in a control specimen is also claimed.

USE/ADVANTAGE - New magnetic particles are used in immunoassays and in biomedical and industrial processes. Their magnetic properties simplify their sepn. from solns. and suspensions.

Abstract (Equivalent): EP 344270 B

Monodispersed magnetic particles of a uniform size distribution and magnetic content comprising: an inner core polymer particle able to absorb a monomer; and a magnetically responsive metal oxide and polymer combination prepared by polymerisation of a mixture of metal oxide and monomer in the presence of initiator in the mixt. said polymer being comprised of monomers able to absorb to said inner core polymer particle, said metal oxide and polymer combination evenly covering said inner core particle, said magnetic particles being of a uniform size distribution, uniform magnetic content, and monodispersed in soln.

Dwg.0/3

Abstract (Equivalent): US 5091206 A

Prodn. of magnetic polymer particle composites comprises coating polymer core particles with a mixt. of magnetic metal oxide particles (mean dia. less than 10 power (-6) m; 1 pt. wt), monomer (0.1-12 pts. wt) and a polymerisation initiator, forming spherical particles with a magnetic coating. The magnetic oxide particles are produced by heating an aq. soln. contg. a mixt. of Fe<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup> salts (molar ratio 0.5-2.0) with aq. alkali to form the metal oxides; the ppt. is collected, washed repeatedly with water, and centrifuged.

Pref. the particles are coated again with a polymer having functional gps. suitable for crosslinking to biologically active substances.

USE - The prods. are covalently linked to antibodies, antigens, enzymes, drug components, etc., to provide materials for affinity chromatography, cell separations, diagnostic and therapeutic applications, industrial processes, etc. (12pp)

## ⑫ 公表特許公報(A)

平2-501753

⑬ 公表 平成2年(1990)6月14日

⑭ Int. Cl.<sup>8</sup>C 08 L 25/08  
C 12 N 11/14  
C 12 Q 1/34

識別記号

LEJ

庁内整理番号

7445-4J  
7329-4B  
6807-4B※審査請求 未請求  
予備審査請求 未請求

部門(区分) 3(3)

(全 13 頁)

⑮ 発明の名称 磁気応答ポリマー粒子の製造法およびその応用

⑯ 特 願 平1-500503

⑰ 出 願 昭63(1988)10月18日

⑱ 翻訳文提出日 平1(1989)6月16日

⑲ 国際出願 PCT/US88/03666

⑳ 国際公開番号 WO89/04373

㉑ 国際公開日 平1(1989)5月18日

優先権主張 ㉒ 1987年10月26日 ㉓ 米国(US) ㉔ 113,294

⑳ 発 明 者 ワン, チアオーフエイ ジェイ アメリカ合衆国 60031 イリノイ、グアニー、フォックスレーン 5040

㉑ 発 明 者 シヤー, デイネツシュ オー アメリカ合衆国 60061 イリノイ、バーノンヒルズ、アレキサンドリアドライブ 235

㉒ 出 願 人 バクスター、インターナショナル、インコーポレイテッド アメリカ合衆国 60015 イリノイ、ダイヤフィールド、バクスターパークウェイ 1

㉓ 代 理 人 弁理士 赤岡 達夫

㉔ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CH(広域特許), DE(広域特許), FR(広域特許), GB(広域特許), IT(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), SE(広域特許)

最終頁に続く

## 請 求 の 範 囲

1. 内部コアポリマー粒子と、前記内部コア粒子を均一に被覆している磁気的に応答する金属酸化物/ポリマーコーティングとよりなる磁性粒子。
2. 前記コア粒子はポリスチレンまたは架橋ポリスチレンよりなる第1項の粒子。
3. 前記コア粒子は約1ないし100ミクロンの範囲である第1項の粒子。
4. 前記磁気的に応答する金属酸化物は約1ミクロン以下である第1項の粒子。
5. 前記磁気的に応答する金属酸化物/ポリマーコーティングは超常磁性、常磁性または強磁性金属酸化物からつくられる第1項の粒子。
6. 前記磁気的に応答する金属酸化物/ポリマーコーティングはポリスチレン、架橋ポリスチレン、官能化ポリスチレンまたは他のオレフィン性モノマーからつくられる第1項の粒子。
7. 前記金属酸化物は遷移金属塩からつくられる第1項の粒子。
8. 前記第1の金属酸化物/ポリマーコーティングを均一に被覆する追加の金属酸化物/ポリマーコーティングを持っている第1項の粒子。
9. 内部コアポリマー粒子と、前記内部コア粒子を均一に被覆している磁気的に応答する金属酸化物/ポリマーコーティングと、前記磁気的に応答する金属酸化物/ポリマーコーティングを被覆している外側ポリマーコーティングよりなる磁性粒子。

10. 前記コア粒子はポリスチレンまたは架橋ポリスチレンよりなる第9項の粒子。
11. 前記コア粒子は約1ないし100ミクロンの範囲である第9項の粒子。
12. 前記磁気的に応答する金属酸化物粒子は約1ミクロン以下である第9項の粒子。
13. 前記磁気的に応答する金属酸化物/ポリマーコーティングは超常磁性、常磁性または強磁性金属酸化物からつくられる第9項の粒子。
14. 前記磁気的に応答する金属酸化物/ポリマーコーティングはポリスチレン、架橋ポリスチレン、官能化ポリスチレンまたは他のオレフィン性モノマーからつくられる第9項の粒子。
15. 前記金属酸化物は遷移金属塩からつくられる第9項の粒子。
16. 前記第1の金属酸化物/ポリマーコーティングを均一に被覆する追加の金属酸化物/ポリマーコーティングを持っている第9項の粒子。
17. 前記外側ポリマーコーティングはポリスチレン、架橋ポリスチレン、官能化ポリスチレンまたは他のオレフィン性モノマーからつくられる第9項の粒子。
18. 内部コアポリマー粒子と、前記内部コア粒子を均一に被覆している磁気的に応答する金属酸化物/ポリマーコーティングと、前記磁気的に応答する金属酸化物/ポリマーコーティングを被覆している外側ポリマーコーティングと、前記外側ポリマーコーティングを被覆している官能化ポリマー層とよりなる磁性粒子。
19. 前記コア粒子はポリスチレンまたは架橋ポリスチレンよりなる

第18項の粒子。

20. 前記コア粒子は約1ないし100ミクロンの範囲である第18項の粒子。
21. 前記磁氣的に应答する金属酸化物粒子は約1ミクロン以下である第18項の粒子。
22. 前記磁氣的に应答する金属酸化物/ポリマーコーティングは超常磁性、常磁性または強磁性金属酸化物からつくられる第18項の粒子。
23. 前記官能化ポリマーは生物学的材料へ結合のためのカルボキシル、アミノまたはヒドロキシ官能基を提供する化合物の群から選ばれる第18項の磁性粒子。
24. 前記官能化ポリマーは生物学的材料へ結合される第18項の磁性粒子。
25. 前記磁氣的に应答する金属酸化物/ポリマーコーティングはポリスチレン、架橋ポリスチレンまたは官能化ポリスチレンからつくられる第18項の粒子。
26. 前記第1の金属酸化物/ポリマーコーティングを均一に被覆する追加の金属酸化物/ポリマーコーティングを持っている第18項の粒子。
27. 前記金属酸化物は遷移金属塩からつくられる第18項の粒子。
28. 内部コアポリマー粒子と、前記内部コアポリマー粒子を均一に被覆している磁氣的に应答する金属酸化物/ポリマーコーティングと、前記金属酸化物/ポリマーコーティングを被覆している官能化ポリマー層とよりなる磁性粒子。
29. 前記内部コア粒子はポリスチレン、架橋ポリスチレンまたは他

38. 前記金属酸化物/ポリマー粒子は、

- (a) 前記金属酸化物/ポリマー粒子を二価および三価遷移金属塩と水酸化ナトリウムとの混合物で加熱しそして沈澱し、
  - (b) 前記沈澱金属酸化物/ポリマー粒子を中性pHになるまで洗浄し、
  - (c) 前記金属酸化物/ポリマー粒子を脱イオン水に再懸濁し、
  - (d) 前記金属酸化物/ポリマー粒子の凝集物を破壊するため前記金属酸化物/ポリマー粒子をかきまぜ、
  - (e) 前記金属酸化物/ポリマー粒子の粒度分布をせばめるため低速遠心することによって製造される第37項の方法。
39. 前記金属酸化物/ポリマー粒子は金属酸化物/ポリマーコーティングを形成するモノマーと混合され、前記モノマーはスチレン、ジビニルベンゼン、メチルメタクリレート、グリシジルメタクリレートおよび他のオレフィン性モノマーからなる群から選ばれる第37項の方法。
40. 前記ポリマーコア粒子は1ないし100ミクロンである第37項の方法。
41. 約1ミクロン以下の金属酸化物粒子を集めること、

前記金属酸化物粒子を金属酸化物/ポリマーコーティングを形成するモノマーと混合すること、

開始剤の存在下ポリマーコア粒子を前記金属酸化物/ポリマー粒子で被覆すること、  
を含む金属酸化物/ポリマーコーティングによって均一に被覆されたポリマーコア粒子を有する磁氣的に应答する金属酸化物生物学的材料保持ポリマー粒子の製造法。

のポリマーからつくられる第28項の粒子。

30. 前記コア粒子は約1ないし100ミクロンの範囲である第28項の粒子。
31. 前記磁氣的に应答する金属酸化物粒子は約1ミクロン以下である第28項の粒子。
32. 前記磁氣的に应答する金属酸化物/ポリマーコーティングは超常磁性、常磁性または強磁性金属酸化物からつくられる第28項の粒子。
33. 前記官能化ポリマーは生物学的材料へ結合される第28項の粒子。
34. 前記磁氣的に应答する金属酸化物/ポリマーコーティングはポリスチレン、架橋ポリスチレンまたは官能化ポリマーからつくられる第28項の粒子。
35. 前記金属酸化物は遷移金属塩からつくられる第28項の粒子。
36. 前記第1の金属酸化物/ポリマーコーティングを均一に被覆している追加の金属酸化物/ポリマーコーティングを持っている第28項の粒子。
37. 約1ミクロン以下の金属酸化物粒子を集めること、  
前記金属酸化物粒子を金属酸化物/ポリマーコーティングを形成するモノマーと混合すること、  
開始剤の存在下ポリマーコア粒子を前記金属酸化物/ポリマー粒子で被覆すること、  
を含む金属酸化物/ポリマーコーティングによって均一に被覆されたポリマーコア粒子を有する磁氣的に应答するポリマー粒子の製造法。

42. 前記金属酸化物/ポリマー粒子は、

- (a) 前記金属酸化物/ポリマー粒子を二価および三価遷移金属塩と水酸化ナトリウムとの混合物で加熱しそして沈澱し、
  - (b) 前記沈澱金属酸化物/ポリマー粒子を中性pHになるまで洗浄し、
  - (c) 前記金属酸化物/ポリマー粒子の凝集物を破壊するため前記金属酸化物を脱イオン水に再懸濁し、
  - (d) 前記金属酸化物/ポリマー粒子の粒度分布をせばめるための低速遠心することによって製造される第41項の方法。
43. 前記金属酸化物/ポリマー粒子は金属酸化物/ポリマーコーティングを形成するモノマーと混合され、前記モノマーはスチレン、ジビニルベンゼン、メチルメタクリレートおよび他のオレフィン性モノマーからなる群から選ばれる第41項の方法。
44. 前記ポリマーコア粒子は1ないし100ミクロンである第41項の方法。

45. 官能化ポリマーへ結合した抗体に対して特異性のリガンドを有する第16項または第28項の磁性粒子を懸濁液を形成するように液体標本と接触させること、

前記懸濁液を十分な抗体が前記特異性リガンドと反応するまでインキュベートすること、

前記磁性粒子を前記懸濁液から分離すること、  
前記分離した磁性粒子へ前記抗体に対して特異性の第2の標識したリガンドを加えること、

前記懸濁液を十分な抗体が前記抗体に対して特異性の第2の標識したリガンドと反応するまでインキュベートすること、

- 前記磁性粒子を前記懸濁液から分離すること、  
 前記磁性粒子へ結合した標識したリガンドの量を測定すること、  
 測定した標識したリガンドの量を対照サンプルについて測定した検体の量と相関させること、  
 を含む検体の存在もしくは濃度を決定する方法。
46. 前記第2のリガンドは $\beta$ -D-ガラクトシダーゼで標識され、  
 そして前記磁性粒子へ結合した標識したリガンドの量は基質4-メチルベリフェリル $\beta$ -ガラクトピラノシドと蛍光アナライザーを使用して測定される第45項の方法。
47. 前記蛍光アナライザーは約365nm励起および約450nm発光フィルターを有する第45項の方法。
48. 前記検体は酵素、ホルモン、ペプチド、ビタミン、核酸、オリゴヌクレオチド、生物学的組織、抗原、抗体およびハプテンからなる群から選ばれる第45項の方法。
49. ウシ血清アルブミンが前記官能化ポリマーへ結合される第45項の方法。
50. 核酸標的分子中の特異性核酸シーケンスの存在または濃度を決定する方法であって、  
 官能化ポリマーへ結合した、前記標的分子の前記核酸シーケンスに対して相補的な核酸シーケンスを有する第18項または第28項の磁性粒子を懸濁液を形成するように流体標本と接触させること、  
 前記懸濁液をハイブリダイゼーション条件下ハイブリダイゼーションを許容するに十分な時間インキュベートすること、  
 前記磁性粒子を前記懸濁液から分離すること、

55. 前記生物質は生物学的細胞である第54項の方法。
56. 前記生物質はタンパクである第54項の方法。
57. 前記生物質は骨髄細胞である第54項の方法。
58. 望まない生物質に対して特異性リガンドを有する第18項または第28項の磁性粒子を接触させること、  
 前記懸濁液を十分な生物質が前記リガンドと反応するまでインキュベートすること、  
 前記磁性粒子を前記懸濁液から分離すること、  
 望まない生物質を含まない懸濁液を得ること、  
 を含む望まない生物質の除去方法。
59. 前記生物質は生物学的細胞である第58項の方法。
60. 前記生物質はタンパクである第58項の方法。
61. 第18項または第28項の磁性粒子を使用して産業廃棄物から望まない物質を除去することによる産業廃棄物精製方法。

前記標的分子の前記核酸シーケンスに対して相補的な第2の標識した核酸シーケンスを加えること、

前記懸濁液をハイブリダイゼーション条件下ハイブリダイゼーションを許容するに十分な時間インキュベートすること、

前記磁性粒子を前記懸濁液から分離すること、  
 前記標識によって前記磁性粒子上のデュプレックス生成を検出すること、

を含む前記方法。

51. 前記第2のリガンドは $\beta$ -D-ガラクトシダーゼで標識され、  
 そして前記磁性粒子へ付着した標識したリガンドの量は基質4-メチルウンベリフェリル $\beta$ -ガラクトピラノシドおよび蛍光アナライザーを用いて測定される第50項の方法。
52. 前記蛍光アナライザーは約365nmおよび約450nm発光フィルターを持っている第50項の方法。
53. 前記標的分子の前記核酸シーケンスに対して相補的な前記標識した核酸シーケンスはビオチンで標識され、そして前記標識は標識したアビジンにより増幅される第50項の方法。
54. 生物質に対し特異性リガンドを有する第18項または第28項の磁性粒子を接触させること、  
 前記懸濁液を十分な生物質が前記リガンドと反応するまでインキュベートすること、  
 前記磁性粒子を前記懸濁液から分離すること、  
 前記磁性粒子を前記生物質から分離すること、  
 実質上純粋な生物質を得ること、  
 を含む生物質の単離方法。

明 細 書

磁気応答ポリマー粒子の製造法およびその応用

#### 本発明の分野

本発明は、磁気応答ポリマー粒子の製造法と、それらのイムノアッセイ、生医学および産業用途における使用に関する。

#### 本発明の背景

イムノアッセイ、アフィニティ精製等の多数の生物学的技術は結合分画の遊離分画からの分離を必要とする。磁性粒子が所望の分離を容易にするために使用されている。

磁性粒子は種々のプロセスを用いて種々の特性を有する種々の粒状および磁性物質から形成されている。例えば、池田らの米国特許第4,582,622号はゼラチン、水溶性ポリサッカライド、リン酸ナトリウムおよび強磁性物質からなる磁性粒子を開示し、米国特許第4,628,037号および第4,554,088号は高分子シランのコートによって囲まれた磁性金属化合物よりなる磁性粒子を開示し、米国特許第4,452,773号は水溶性ポリサッカライドもしくは官能基を有するその誘導体によって被覆された強磁性酸化鉄( $Fe_3O_4$ )のコアを有する別々のコロイドサイズの粒子を開示し、そしてマンスフィールドの米国特許第4,297,337号は磁性ガラスもしくは結晶含有材料を粒子状担体として開示する。

#### 本発明の概要

本発明は、形状および組成に関係なく、直径約1ないし100ミ



クロンの平均サイズを有する、以後磁性粒子と呼ぶ磁気応答ポリマー粒子の新規製造法を提供する。

本発明の磁性粒子は、約1ミクロン以下の平均サイズを持った、以下金属酸化物と呼ぶ磁気応答金属酸化物を最初製造し、次に高分子コア粒子を金属酸化物を含んでいるポリマーの層で被覆することによって製造することができる。これら磁性粒子の表面は所望の表面特性を与えるためポリマーもしくは官能化したポリマーの他の層でさらに被覆することができる。

本発明によって製造される磁性粒子はあらゆる表面をもってサイズが単分散され、そして約5%ないし50%、好ましくは10%ないし25%の磁性金属酸化物含量を有する。これら特性を持っている粒子はイムノアッセイおよび多種類の生医学用途に有用であることがわかった。これら磁性粒子は抗原、抗体、酵素またはDNA/RNAのような生物学的材料の受動的もしくは共有結合カップリングのために使用し、そして種々のタイプのイムノアッセイ、DNA/RNAハイブリッド化アッセイ、アフィニティー精製、細胞分離および他の生医学用途のための固相として使用することができる。この磁性粒子はまた、産業廃棄物の処理のような産業用途にも使用することができる。

#### 目的および利益

本発明の目的は、

磁気応答ポリマー粒子を容易に入手し得るポリマー粒子から容易に製造する方法を開発すること、

緩やかな沈降と速い磁気分離を有する磁気応答ポリマー粒子を製造する方法を開発すること、

する2価金属塩のモル比は得られる磁性粒子の色相にも影響を及ぼし、このモル比が小さいほど得られる磁性粒子の褐色が明るくなる。好ましくは金属酸化物は超常磁性または常磁性であるが、磁気分離でなく遠心をクリーンアップの間使用する限り強磁性金属酸化物も使用できる。

マンガン、マグネシウム、コバルト、ニッケル、亜鉛および銅のような他の2価遷移金属塩を2価鉄塩に代えてもよい。

金属酸化物が沈降した後、上清がpH中性になるまで250×gにおいて遠心して数回洗浄する。金属酸化物は脱イオン水中に再懸濁し、そして金属酸化物結晶の塊を破碎するため高速度で機械的にかきまぜる。小さい寸法の金属酸化物結晶を含んでいる上清を集め、そしてペレットを脱イオン水中に再懸濁する。このプロセスは少なくとも3回、または金属酸化物の大部分が250×gでペレット化しなくなるまで繰返す。大きな結晶を除去するための100×gにおける低速度遠心はサイズを0.8ミクロン以下に減らすであろう。

1.0ミクロン以下の平均サイズを有する金属酸化物はモノマーと混合し、開始剤の存在下1ないし100ミクロンのサイズのポリマーコア粒子、好ましくはポリスチレン粒子上に被覆される。少量の乳化剤の添加は粒子の凝集防止を助けるであろう。磁性粒子は次に金属酸化物の析下を防止するためポリマー、好ましくはポリスチレンの保護層で被覆される。もし官能化した磁性粒子を望むならば、磁性粒子は生物学的材料の共有結合のためのカルボキシル、アミノまたはヒドロキシのような官能基を与える官能化したポリマーの他の層でさらに被覆することができる。

本発明によって製造される磁性粒子は第1図に図示することがで

種々の表面電荷、および生物学的材料の受動的吸着もしくは共有結合のための官能基を有する、磁気応答ポリマー粒子の製造法を開発すること、

これら磁気応答ポリマー粒子を使用する医学的、生物学的、診断および産業用途を開発することである。

本発明の利益は、

約1ないし100ミクロンのサイズを有する多種類のポリマーコアを磁気応答粒子へ変換できること、

金属酸化物を用途に応じて変えることができること、

表面を共有結合のための多種類の官能基へ誘導体化できること、多種類のモノマーを生成するポリマーの異なった表面特性を得るように最終コーティングに使用できること、

架橋および架橋しない磁気応答粒子を製造できること、

単分散磁気応答ポリマー粒子を製造できることである。

#### 本発明の詳細な説明

本発明の磁性粒子は、約1ミクロン以下の平均サイズを持った金属酸化物を最初に製造することによって製造することができる。金属酸化物は2価および3価の金属塩の混合物、好ましくは硫酸もしくは塩化第一鉄もしくは第二鉄の混合物を水酸化ナトリウムと加熱しそして沈降させることによって製造される。3価金属塩に対する2価金属塩のモル比は、金属酸化物の所望のサイズおよび磁気特性を得るため、0.5から2.0、好ましくは0.5から1.0まで変化させることができる。3価金属塩に対する2価金属塩のモル比は金属酸化物のサイズに影響し、3価の金属塩に対する2価の金属塩のモル比が小さいほど金属酸化物のサイズが小さくなる。3価金属塩に対

き、該図においてAはコア粒子を表し、Bは金属酸化物/ポリマーコーティングを表し、Cは保護ポリマーコーティングを表し、そしてDは官能化ポリマーコーティングを表す。第2図は本発明によって製造された磁性粒子の0.08ないし0.1ミクコンスライスの透過型電子顕微鏡写真を示す。第3図は本発明によって製造された6.8ミクロン磁性粒子の走査型電子顕微鏡写真を示す。第3a図は1000倍であり、第3b図は5000倍である。

本発明において有用なポリマーコア粒子は、小粒子の分散液として得ることができ、そしてモノマーを吸収しそれによって金属酸化物およびモノマー混合物をコア粒子の表面に被覆することができる任意のポリマーのものでよい。コア粒子は任意の寸法および形状、好ましくは寸法が1ないし100ミクロンで形状が球形のものがよい。単分散コア粒子を使用するときは、生成する磁性粒子も寸法が単分散であろう。コア粒子は、ジビニルベンゼン等のような架橋剤の存在または不存在下、乳化重合、懸濁重合または他の重合手段によって得ることができる。コア粒子を製造するために使用できるモノマーの中にはスチレン、メタクリル酸メチル、ビニルトルエン等がある。モノマーの混合物も使用できる。磁性金属酸化物被覆または保護被覆のために使用するモノマーはコア粒子と同じタイプでも同じタイプでなくてもよい。コア粒子に対する金属酸化物被覆に使用するモノマーの重量比は、所望する金属酸化物/ポリマー層の厚みに応じ、0.1ないし1.2、好ましくは0.2ないし6でよい。第一鉄塩および第二鉄塩の混合物から製造した金属酸化物を被覆に使用する時は、コア粒子に対するモノマー重量比約0.1ないし0.5を使用するのが好ましい。しかしながらマンガン(II)および第二鉄塩

の混合物から製造した金属酸化物を被覆に使用するとき、コア粒子に対するモノマーの重量比は0.1ないし1.2でよい。通常の有機媒質に不活性な架橋した磁性粒子が望ましい結果、架橋剤2ないし10重量%、好ましくは8ないし10重量%を含み、コア粒子に対するモノマー重量比3ないし1.2、好ましくは4ないし6のモノマーをもってマンガン(II)および第二鉄塩の混合物からつくった金属酸化物を使用するのが好ましい。金属酸化物/ポリマー被覆の間低い(すなわち0.1ないし0.5)モノマー対コア粒子重量比を使用する時は、磁性粒子の表面へ金属酸化物をさらに付着するため生成する磁性粒子をポリマー被覆の保護層でさらに被覆することが好ましい。しかしながら高いモノマー対コア粒子比(すなわち8ないし1.2)を使用する時は、保護ポリマーコーティングは不必要である。重合温度は50℃ないし90℃、好ましくは55℃ないし65℃でよい。重合開始剤は過硫酸カリウム等のような水溶性でも、過酸化ベンゾイル等のような水不溶性のどちらでもよい。放射線、イオン化等のような他の重合開始手段も使用し得る。予想外にも、この磁性粒子はマンガン(II)および第二鉄塩混合物からつくった金属酸化物を被覆に使用する時は乳化剤を少しも使用することなく製造できることがわかった。しかしながら第一および第二鉄塩混合物からつくった金属酸化物を被覆のために使用する時は、ドデシル硫酸ナトリウム、Aerosol 22, Tween 20またはNonidet P-40(NP 40)のような乳化剤の少量は金属酸化物/ポリマーコーティングの間粒子の広汎な凝集を防止するのに有用であることが判明した。同じ能力を有する他の乳化剤も使用し得る。磁性金属酸化物含量は、金属酸化物/ポリマーコーティングの間金属酸化物の異なる量を使用するこ

とにより、5%から50%、好ましくは10%から25%まで変えることができる。金属酸化物含量を増すため多層金属酸化物/ポリマー被覆を採用することもできる。重合に通常使用される他の成分も所望の特性を持った磁性粒子を得ることができる限り添加してもよい。金属酸化物/ポリマーコーティングのための成分は、金属酸化物/ポリマーコーティングプロセスの始めに全部一時に加えることも、または段階的に加えることもできる。第一および第二鉄塩混合物からつくった金属酸化物を使用するときは、成分を段階的に加えるのが好ましい。成分は真空もしくはアルゴンのような不活性ガスのもとに機械的かきまぜ、転倒または他のかきまぜ手段によって混合することができる。官能基は、金属酸化物/ポリマーコーティングの間モノマーと官能化モノマーの混合物を使用するか、または終わりに磁性粒子を官能化モノマーの薄い層でオーバーコートすることにより、磁性粒子の表面へ取込むことができる。使用する官能化モノマーは、メタクリル酸2-ヒドロキシエチル、メタクリル酸2-アミノエチル、トリメチルアンモニウムメチルメタクリレート、メトサルフェート、ジメチルアミノエチルメタクリレート、メタクリル酸、ウンデシレン酸、メチルプロペンシルホン酸、ウンデシレニルアルコール、オレイルアミン、グリシジルメタクリレート、アクロレイン、グルタルアルデヒド等の1種または混合物から選ぶことができる。磁性粒子は金属酸化物/ポリマーコーティングまたは保護コーティングに使用したものと異なるポリマーの層でオーバーコーティングし、該ポリマーの表面特性を取入れることができる。

#### 磁性粒子の用途

螢光イムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ、酵素イムノアッセイ

I、細胞分離、酵素固定化およびアフィニティ精製のような種々の応用のための固相としての磁性粒子の種々の用途は、以下の論文によって例示される文献に解説されている。Hirschbein et al, Chemical Technology, March 1982, 172-179(1982); Halling and Dunnill, Enzyme Microbe Technology, 2:2-10(1980); Mosbach and Anderson, Nature, 270: 259-261(1977); Guedson et al, J. Allergy Clinical Immunology, 61(1), 23-27(1978)。いくつかの応用についても、酵素固定化について米国特許第4, 152, 210号および第4, 343, 901号、細胞分離について米国特許第3, 970, 518号、第4, 230, 685号、第4, 267, 234号、イムノアッセイについて米国特許第4, 554, 088号、第4, 628, 037号および第3, 933, 997号に開示されている。

ある磁性粒子は一つの用途に有用であっても、他の用途においてはそうでないことがある。例えば、高分子シランの被覆によって一般に取固まれた超常磁性金属酸化物コアを含む、米国特許第4, 554, 088号および第4, 628, 037号に開示されている磁性粒子は、大きい表面積と遅い沈降速度のためイムノアッセイおよびアフィニティ精製において有用かも知れないが、しかし骨髄造放のような細胞分離用途においては適当でない。これら二つの特許に開示されている磁性粒子の寸法のため、細胞懸濁液から磁性粒子のすべてを効果的に除去することは非常に困難である。さらに、正常細胞への小さい磁性粒子の非特異的結合が高くなるであろう。骨髄造放のための磁性粒子の使用においては、磁性粒子はヒツジ抗マウスIgGのような抗体で被覆され、そして骨髄はがん細胞表面抗

原に対するいくつかのモノクローナル抗体の混合物で処理される。磁性粒子はがん細胞のみに結合し、それらを強い磁場を通過させることにより正常細胞から分離させるであろう。浄化された細胞は次に患者へ戻される。

本発明方法を使用することにより、磁性粒子は多種の生医学的応用のために寸法、表面積、金属酸化物含量および表面特性について最適化されることができる。本発明によって製造された磁性粒子は酵素イムノアッセイ、螢光イムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ、DNA/RNAハイブリダイゼーションアッセイ、および他の診断用途に対する固相として使用することができる。イムノアッセイは、当業者には自明なサンドイッチアッセイおよび競合的結合アッセイのような種々の形態を使用して実行することができる。DNA/RNAハイブリダイゼーションも固相ハイブリダイゼーションまたは液相ハイブリダイゼーションのような種々の形態を使用して実行することができる。固相ハイブリダイゼーション形態においては、DNAもしくはRNAプローブ(キャッチャープローブ)が最初に磁性粒子上に固定化される。次に固定化したキャッチャープローブはサンプル(サンプルDNA)からのDNAの相補的鎖とハイブリダイズするために使用される。最後に螢光、放射能もしくは酵素トレーサーで標識され、サンプルDNAの他の部分とハイブリダイズすることができる他のプローブ(信号プローブ)が信号発生のために使用される。液相ハイブリダイゼーション形態においては、キャッチャープローブおよび信号プローブが最初液相でサンプルDNAとハイブリダイズすることが許容され、次いで磁性粒子へ固定化される。

その代わりに、信号プローブも1個もしくは数個のビオチン基で標識することができ、そして信号はアッセイの感度を増強するため該ビオチン基をアビジン標識した蛍光、放射性もしくは酵素トレーサーと結合することによって検出される。

イムノアッセイおよびDNA/RNAハイブリダイゼーションアッセイは、生物学的サンプル中の薬物、ホルモン、抗体、ペプチド、DNA、RNA、ヌクレオチッド、ビールス抗原および炭水化物のような多種類の化合物を測定するために使用することができる。

本発明によって製造された磁性粒子はアフィニティ精製、細胞分離、酵素固定化および他の生医学的用途にも使用することができる。細胞分離においては、磁性粒子は免疫学的反応または非免疫学的反応によって望まない細胞を除去するため（ネガティブセレクション）、または望む細胞をエンリッチするため（ポジティブセレクション）に使用される。この原理は骨髓からがん細胞を除去するため（骨髓追放）、組織培養のためポジティブもしくはネガティブセレクションにより細胞集団を精製するため、および種々の細胞イムノアッセイ等を実施するために使用することができる。アフィニティ精製においては、磁性粒子は抗体、抗原、酵素、阻害剤、共因子、単一鎖DNA、結合タンパク、ハプタンおよび炭水化物等のような多種類の生物学的材料を精製するため、ポリアクリルアミドゲル、セファロースゲルもしくは他のセルロースビーズのような慣用の固相の代わりに使用される。アフィニティ精製に似た他の応用においては、磁性粒子は抗血清または臨床サンプルから望まないタンパク成分を交差吸着し、そして除去するために使用することができる。酵素固定においては、酵素は酵素活性を保存しそして固定化酵素の再使用

を許容するような種々の結合方法によって磁性粒子上へ固定化される。酵素を固定化した磁性粒子は、炭水化物、アミノ酸、およびタンパク等のような多種類の物質を製造するため固定化酵素系に普遍に用いられるガラスビーズ、制御されたポアガラス、シリカゲルおよびセルロースビーズ等のような他の固相に代えるために使用することができる。

本発明によって製造される磁性粒子は有害製品、すなわち工業材料から有機または無機溶剤を除去するため産業廃棄物処理のような工業的用途に使用することができる。

これら応用は磁性粒子の大部分に共通な分離容易性、速い反応速度および大きい表面積によってすべて容易化される。以下の実施例は本発明の多様性および利益をさらに例証するために提供され、それらの細部は、本発明の精神および範囲を逸脱することなく種々の均等物、変更および修飾を加え得ることが自明であり、かつそのような均等具体例は其中に含まれることが意図されると理解されるから、限定と解すべきでない。

#### 金属酸化物の製造のための一般的操作

##### 実施例1

機械的攪拌機、コンデンサー、温度計、滴下漏斗、および加熱マントルを備えた三頸フラスコへ、脱イオン水400ml中硫酸第一鉄0.361モルおよび硫酸第二鉄0.369モル（ $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  比=1）を含んでいる混合物を入れた。混合物をかきまぜながら85ないし90℃へ加熱し、6N水酸化ナトリウム850mlを90分にわたって滴下した。混合物をさらに1時間85ないし90℃においてかきまぜ、室温へ冷却した。金属酸化物沈澱を250×gにおいて

て10分間遠心した。透明な上清を傾かし、ペレットを脱イオン水900ml中に機械的攪拌機を使用して再懸濁した。この清浄化プロセスを6回、もしくは上清のpHが殆ど中性になるまでくり返した。上清を傾かし、脱イオン水200mlに再懸濁した。250×gにおけるそれ以上の遠心は金属酸化物沈澱のすべてをペレット化しないであろう。小寸法の金属酸化物を含んでいる上清を集め、ペレットを脱イオン水200ml中に再懸濁した。このプロセスを少なくとも3回、または金属酸化物の大部分が250×gにおいてもはやペレット化しなくなるまでくり返した。この方法で得られる金属酸化物は通常2.0ミクロン以下の寸法を有する。合併した金属酸化物懸濁液を100×gにおいて10分間遠心した。上清を集め、0.8ミクロン以下の寸法を有する8.6%w/v磁性金属酸化物懸濁液800mlを与えた。

##### 実施例2

脱イオン水400ml中硫酸第一鉄0.235モル、硫酸第二鉄0.297モル（ $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  比=0.79）と、そして6N水酸化ナトリウム480mlを使用し、磁性金属酸化物の2.86%w/v懸濁液2000mlを得たことを除き、実施例1に記載したのと同じ操作をくり返した。

##### 実施例3

脱イオン水400ml中硫酸第一鉄0.178モル、硫酸第二鉄0.298モル（ $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  比=0.59）および6N水酸化ナトリウム520mlを使用し、磁性金属酸化物の2.98%w/v懸濁液1500mlを得たことを除き、実施例1に記載した同じ操作をくり返した。

##### 実施例4

脱イオン水400ml中硫酸第一鉄0.15モル、硫酸第二鉄0.276モル（ $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  比=0.54）および6N水酸化ナトリウム520mlを使用し、磁性金属酸化物の6.88%w/v懸濁液700mlを得たことを除き、実施例1に記載した同じ操作をくり返した。

##### 実施例5

脱イオン水225ml中硫酸第一鉄0.116モル、硫酸第二鉄0.146モル（ $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  比=0.79）および6N水酸化ナトリウム240mlを用い、磁性金属酸化物の1.8%w/v懸濁液1700mlを得たことを除き、実施例1に記載の同じ操作をくり返した。

#### 磁性粒子の製造

##### 実施例6

脱イオン水600ml、スチレン6ml、および実施例1で製造した8.6%w/v磁性金属酸化物80mlの混合物をシールしたびんへ入れた。びんを脱気し、55℃のオーブン中1時間約60rpmで回転した。この混合物へ過硫酸カリウム12gと5%w/v 4.0ミクロンポリスチレン粒子850mlを加えた。びんを再シールし、脱気し、そして1時間回転し、2%ドデシル硫酸ナトリウム50mlを加えた。さらに5時間後スチレン6mlと過硫酸カリウム10gを混合物へ加えた。混合物をさらに15時間回転し、チーズ布二層でろ過し、磁気分離し、そして上清が透明になるまで脱イオン水で数回洗った。得られる磁性粒子を脱イオン水で1.6gに再懸濁し、磁性金属酸化物含量約1.1%および平均寸法4.3ミクロンを持った2.5%w/v懸濁液を得た。

##### 実施例7



実施例6に記載したように製造した2.5%w/v磁性粒子1.6gを、ドデシル硫酸ナトリウム1g、過硫酸カリウム10g、およびメタノール4cc中ウンデシレン酸0.98ccおよびジビニルベンゼン0.02ccを含有する溶液を加えることにより、カルボキシル化した。混合物をシールしたびんへ入れ、脱気し、55℃オープン中約5時間回転した。生成したカルボキシル磁性粒子を磁気分離し、上清が透明になるまで脱イオン水で数回洗った。カルボキシル磁気粒子を脱イオン水で680ccへ再懸濁し、磁性金属酸化物含量約1.1%と平均寸法4.3ミクロンを持った5.8%w/v懸濁液を得た。

実施例8

脱イオン水600cc、スチレン6ccおよび実施例1記載のように製造した8.6%w/v磁性金属酸化物80ccをシールしたびんへ入れた。びんを脱気し、55℃オープン中で1時間回転した。混合物へ過硫酸カリウム12gと4.78%w/v 6.1ミクロンポリスチレン粒子を加えた。びんを再シールし、脱気し、5時間回転し、そしてスチレン6ccと過硫酸カリウム10gを加えた。混合物をさらに15時間回転し、チーズ布2層で口過し、磁気分離し、上清が透明になるまで脱イオン水で数回洗った。得られた磁性粒子を脱イオン水で1.5gへ再懸濁し、ドデシル硫酸ナトリウム1g、過硫酸カリウム10g、メタノール4cc中ウンデシレン酸0.98ccおよびジビニルベンゼン0.02ccを含有する溶液を加えることによりカルボキシル化した。混合物をシールしたびんへ入れ、脱気し、55℃オープン中で5時間回転した。得られたカルボキシル磁性粒子を磁気分離し、上清が透明になるまで脱イオン水で数回洗った。カルボキシル磁性粒子を脱イオン水で800ccへ再懸濁し、磁性金属酸化物含

量約1.6%と平均寸法5.8ミクロンを有する4.3%w/v懸濁液を得た。

#### 実施例9

脱イオン水600cc、スチレン6cc、および実施例1記載のように製造した8.6%w/v磁性金属酸化物を含有する混合物を三頸丸底フラスコへ入れ、67℃でアルゴン中1時間かきまぜた。混合物へ過硫酸ナトリウム12gおよび5%w/v 2.7ミクロンポリスチレン粒子470ccを加えた。混合物を67℃で1時間かきまぜ、そしてドデシル硫酸ナトリウム2%溶液30ccを加えた。アルゴン中67℃でさらに5時間かきまぜた後、スチレン6ccおよび過硫酸カリウム6gを混合物へ加えた。混合物をアルゴン中67℃でさらに15時間かきまぜ、チーズ布2層で口過し、磁気分離し、そして上清が透明になるまで脱イオン水で数回洗った。得られた磁性粒子を脱イオン水で900ccへ再懸濁し、そしてドデシル硫酸ナトリウム0.6g、過硫酸カリウム10g、およびメタノール2.4cc中ウンデシレン酸0.598ccおよびジビニルベンゼン0.012ccを含有する溶液を加えることによりカルボキシル化した。混合物をシールしたびんへ入れ、脱気し、55℃オープン中で5時間約60rpmで回転した。得られたカルボキシル磁性粒子を磁気分離し、上清が透明になるまで脱イオン水で数回洗った。カルボキシル磁性粒子を500ccへ再懸濁し、磁性金属酸化物含量約1.4%と平均寸法4.0ミクロンを有する6.5%w/v懸濁液を得た。

#### 実施例10

脱イオン水600cc、スチレン6cc、および実施例1記載のように製造した8.6%w/v磁性金属酸化物60ccを含有する混合

シールしたびんへ入れた。びんを脱気し、55℃オープン中で1時間約60rpmで回転した。混合物へ過硫酸カリウム12gおよび5%w/v 2.7ミクロンポリスチレン粒子470ccを加えた。びんを再シールし、脱気し、そして1時間回転し、2%ドデシル硫酸ナトリウム30ccを加えた。さらに5時間後、スチレン6ccと過硫酸カリウム10gを混合物へ加えた。混合物をさらに15時間回転し、チーズ布2層で口過し、磁気分離し、そして上清が透明になるまで脱イオン水で数回洗った。得られた磁性粒子は脱イオン水で500ccへ再懸濁し、磁性金属酸化物含量約1.4%と平均寸法4.0ミクロンを有する6.8%w/v懸濁液を得た。

#### 実施例11

脱イオン水180cc、スチレン2cc、および実施例1記載のように製造した8.6%w/v磁性金属酸化物20ccを含有する混合物をシールしたびんへ入れた。びんを脱気し、55℃オープン中で1時間約60rpmで回転した。混合物へ過硫酸カリウム4gと実施例10で製造した6.8%w/v磁性粒子160cc(3.0ミクロン、金属酸化物含量1.4%)を加えた。びんを再シールし、脱気し、1時間回転し、2%ドデシル硫酸ナトリウム10ccを加えた。さらに5時間後、スチレン2ccおよび過硫酸カリウム2gを混合物へ加えた。混合物をさらに15時間回転し、チーズ布2層で口過し、磁気分離し、上清が透明になるまで脱イオン水で数回洗った。得られた磁性粒子は脱イオン水で160ccへ再懸濁し、磁性金属酸化物含量約1.9%と平均寸法4.2ミクロンを有する7.78%w/v懸濁液を得た。

実施例12

脱イオン水90cc、スチレン1cc、および実施例1記載のように

製造した8.6%w/v磁性金属酸化物10ccを含有する混合物をシールしたびんへ入れた。びんを脱気し、55℃オープン中で1時間約60rpmで回転した。混合物へ過硫酸カリウム1gおよび実施例11で製造した7.78%w/v磁性粒子80cc(3.2ミクロン、金属酸化物含量1.9%)を加えた。びんを再シールし、脱気し、4時間回転し、2%ドデシル硫酸ナトリウム5ccを加えた。さらに5時間後、スチレン1ccと過硫酸カリウム1gを混合物へ加えた。混合物をさらに15時間回転し、チーズ布2層で口過し、磁気分離し、そして上清が透明になるまで脱イオン水で数回洗った。得られた磁性粒子は脱イオン水で160ccへ再懸濁し、金属酸化物含量約2.3%と平均寸法4.5ミクロンを有する4.5%w/v懸濁液を得た。

#### 実施例13

脱イオン水400cc、スチレン1.92cc、ジビニルベンゼン0.08cc、過硫酸カリウム4g、200~400メッシュ4%ジビニルベンゼン架橋ポリスチレンビーズ20g、および実施例1記載のように製造した8.6%w/v磁性金属酸化物10ccを含有する混合物をシールしたびんへ入れた。びんを脱気し、55℃オープン中で15時間約60rpmで回転した。混合物を沈降させ、上清を傾けさせた。得られた磁性ビーズを脱イオン水200cc中に再懸濁し、再び沈降させた。このプロセスを上清が透明になるまで数回くり返した。得られた磁性ビーズを脱イオン水200cc中に再懸濁し、ドデシル硫酸ナトリウム0.1g、過硫酸カリウム20g、スチレン0.48cc、ジビニルベンゼン0.02ccを加えた。びんを再シールし、脱気し、55℃オープン中で1時間約60rpmで回転し、そしてメタノール0.4cc中ウンデシレン酸0.098ccおよびジビニルベンゼ

ン0.002 ㎖を含有する溶液を加えた。混合物をさらに4時間回転し、以前記載したように重力沈降によって清浄化した。水をろ過によって除去し、カルボキシルビーズを乾燥し、200～400メッシュカルボキシル磁性ビーズ20gを得た。

#### 実施例14

脱イオン水100 ㎖、スチレン0.5 ㎖、過硫酸カリウム2g、5%w/v 4.0ミクロンポリスチレン粒子75 ㎖、および実施例4記載のように製造した6.88%w/v 磁性金属酸化物10 ㎖を含有する混合物をシールしたびんへ入れた。びんを脱気し、そして55℃オーブン中で15時間約60rpmで回転した。混合物をチーズ布2層でろ過し、磁気分離し、脱イオン水で上清が透明になるまで数回洗った。得られた磁性粒子を脱イオン水で150 ㎖へ再懸濁し、金属酸化物含量約1.4%と平均4.3ミクロンを有する2.5%w/v 懸濁液を得た。

#### 実施例15

実施例4記載のように製造した6.88%w/v 磁性金属酸化物20 ㎖を使用し、金属酸化物含量約1.8%と平均寸法4.3ミクロンを有する2.5%w/v 懸濁液160 ㎖を得たことを除き、実施例14に記載した同じ操作をくり返した。

#### 実施例16

脱イオン水2000 ㎖、スチレン18 ㎖、および実施例3記載のように製造した2.98%w/v 磁性金属酸化物550 ㎖を含有する混合物をシールしたびんへ入れた。びんを脱気し、55℃オーブン中で1時間約60rpmで回転した。混合物へ過硫酸カリウム20gおよび10%w/v 3.0ミクロンポリスチレン粒子950 ㎖を加

液200 ㎖を得たことを除いて、実施例17に記載した同じ操作をくり返した。

#### 実施例20

モノマー、1-ビニル-2-ピロリドン1 ㎖を使用し、表面にポリビニルピロリドンに有する磁性粒子の2.5%w/v 懸濁液を得たことを除いて、実施例17に記載した同じ操作をくり返した。

#### 実施例21

官能化モノマー、メチルプロペンスルホン酸1gを使用し、表面にスルホン酸基を有する磁性粒子の2.5%w/v 懸濁液200 ㎖を得たことを除いて、実施例17に記載した同じ操作をくり返した。

#### 実施例22

官能化モノマー、ジメチルアミノエチルメタクリレート1 ㎖を使用し、表面にジメチルアミノ基を有する磁性粒子の2.5%w/v 懸濁液200 ㎖を得たことを除いて、実施例17に記載した同じ操作をくり返した。

#### 実施例23

7.0%w/v 2.11ミクロンポリスチレン粒子20 ㎖、実施例5に記載したように製造した1.8%w/v 金属酸化物100 ㎖、脱イオン水50 ㎖、およびスチレン7.5 ㎖中過酸化ベンゾイル0.15gを含有する溶液を含有する混合物をシールしたびんへ入れた。びんを脱気し、そして55℃オーブン中で15時間約60rpmで回転した。混合物をチーズ布2層でろ過し、磁気分離し、そして上清が透明になるまで脱イオン水で数回洗った。得られた磁性粒子を脱イオン水で200 ㎖へ再懸濁し、金属酸化物含量約1.6.8%と平均寸法3.6ミクロンを有する5.0%w/v 懸濁液を得た。

えた。びんを再シールし、脱気し、1時間回転し、そして2%ドデシル硫酸ナトリウム50 ㎖を加えた。さらに5時間後、スチレン8 ㎖と過硫酸カリウム10gを混合物へ加えた。混合物をさらに15時間回転し、チーズ布2層でろ過し、磁気分離し、そして上清が透明になるまで脱イオン水で数回洗った。得られた磁性粒子は脱イオン水で3000 ㎖へ再懸濁し、磁性金属酸化物含量約1.2%と平均寸法3.2ミクロンを有する3.38%w/v 懸濁液を得た。

#### 実施例17

実施例16記載のように製造した磁性粒子150 ㎖(3.2ミクロン、金属酸化物含量1.2%を有する3.38%w/v)、1%NP40 2 ㎖、メチルメタクリレートまたはスチレン2 ㎖、過硫酸カリウム1g、および官能化モノマー、トリメチルアンモニウムエチルメタクリレートメトサルフェート(40%水溶液)2 ㎖を含有する混合物をシールしたびんへ入れた。びんを55℃オーブン中で4時間約60rpmで回転した。混合物をチーズ布2層でろ過し、磁気分離し、そして上清が透明になるまで脱イオン水で数回洗った。得られた磁性粒子は脱イオン水で200 ㎖へ再懸濁し、表面にトリメチルアンモニウム官能基を有する磁性粒子の2.5%w/v 懸濁液を得た。

#### 実施例18

官能化モノマー、2-アミノエチルメタクリレート1 ㎖を使用し、表面にアミノ基を有する磁性粒子の2.5%w/v 懸濁液200 ㎖を得たことを除いて、実施例17に記載した同じ操作をくり返した。

#### 実施例19

官能化モノマー、2-ヒドロキシエチルメタクリレート1 ㎖を使用し、表面にヒドロキシル基を有する磁性粒子の2.5%w/v 懸濁

#### 実施例24

7.0%w/v 2.11ミクロンポリスチレン粒子20 ㎖、実施例5記載のように製造した1.8%w/v 金属酸化物100 ㎖、脱イオン水50 ㎖、およびスチレン6.75 ㎖中過酸化ベンゾイル0.15gおよびジビニルベンゼン0.75 ㎖を含有する溶液を含有する混合物をシールしたびんへ入れた。びんを脱気し、55℃オーブン中で15時間約60rpmで回転した。混合物をチーズ布2層でろ過し、磁気分離し、上清が透明になるまで脱イオン水で数回洗った。得られた架橋磁性粒子を脱イオン水で200 ㎖へ再懸濁し、金属酸化物含量約1.6.8%と平均寸法3.6ミクロンを有する5.0%w/v 懸濁液を得た。このようにして製造した架橋磁性粒子は寸法が均一であり、そしてアセトン、アセトニトリルおよびジメチルホルムアミドのような普通の有機溶媒に対して不活性であることがわかった。

#### 実施例25

7.0%w/v 2.11ミクロンポリスチレン粒子20 ㎖、実施例5に記載したように製造した1.8%w/v 金属酸化物150 ㎖、およびスチレン6.75 ㎖中過酸化ベンゾイル0.15gとジビニルベンゼン0.75 ㎖を含む溶液を含有する混合物をシールしたびんへ入れた。びんを脱気し、そして55℃オーブン中で15時間約60rpmで回転した。混合物をチーズ布2層でろ過し、磁気分離し、そして上清が透明になるまで脱イオン水で数回洗った。得られた架橋磁性粒子を脱イオン水で200 ㎖へ再懸濁し、金属酸化物含量約2.3%と平均寸法4.0ミクロンを有する5.4%w/v 懸濁液を得た。このようにして製造した架橋磁性粒子は寸法が均一であり、そしてアセトン、アセトニトリルおよびジメチルホルムアミドのような普通の有

種溶媒に対して不活性であることがわかった。

#### 実施例 26

9.16%w/v 3.2ミクロンポリスチレン粒子15ml、実施例5記載のように製造した1.8%w/v金属酸化物100ml、脱イオン水55ml、およびスチレン6.75ml中過酸化ベンゾイル0.15gおよびジビニルベンゼン0.75mlを含む溶液を含有する混合物をシールしたびんへ入れた。びんを脱気し、そして55℃オーブン中で15時間約60rpmで回転した。混合物をチーズ布2層でろ過し、磁気分離し、上清が透明になるまで脱イオン水で数回洗った。得られた架橋磁性粒子を脱イオン水で200mlへ再懸濁し、金属酸化物含量約16.8%と平均寸法5.5ミクロンを有する4.7%w/v懸濁液を得た。このようにして製造した架橋磁性粒子は寸法が均一であり、そしてアセトン、アセトニトリルおよびジメチルホルムアミドのような普通の有機溶媒に対して不活性であることがわかった。

#### 実施例 27

4.5%w/v 4.1ミクロンポリスチレン粒子30ml、実施例5記載のように製造した1.8%w/v金属酸化物100ml、脱イオン水40ml、およびスチレン6.75ml中過酸化ベンゾイル0.15gおよびジビニルベンゼン0.75mlを含む溶液を含有する混合物をシールしたびんへ入れた。びんを脱気し、55℃オーブン中で15時間約60rpmで回転した。混合物をチーズ布2層でろ過し、磁気分離し、上清が透明になるまで脱イオン水で数回洗った。得られた架橋磁性粒子を脱イオン水で200mlへ再懸濁し、金属酸化物含量約16.9%および平均寸法6.7ミクロンを有する4.5%w/v懸濁液を得た。このようにして製造した架橋磁性粒子は寸法が均一であり、

(0.1M, pH 7.0)で75mlへ再懸濁し、2.0%w/v懸濁液を得た。

受動的吸着によりウシ血清アルブミンを磁性粒子へ結合するため、EDCを使用することなく同じ操作をくり返した。

#### 実施例 30

4mlバイアルへ、実施例7記載のように製造した4.3ミクロン、5.0%w/vカルボキシル磁性粒子1mlを入れた。粒子を磁気分離し、リン酸緩衝液2ml(0.1M, pH 5.5)で1回洗い、同じ緩衝液で2mlへ再懸濁した。この粒子懸濁液へヤギ(Gt)抗マウス(Ms)1g G1.4mg/mlの140mlとそして1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド10mgを加えた。バイアルを室温で2時間上下に回転した。粒子を磁気分離し、リン酸緩衝液2mlで1回洗い、リン酸緩衝食塩水(0.1M, pH 7.0)で2mlへ再懸濁し、2.5%w/v Gt抗Ms 1g G被覆磁性粒子を得た。モノクローナルまたはポリクローナルであれ他の種類の抗体も同じ操作を使用してカルボキシル磁性粒子へ結合することができた。

Gt抗Ms 1g Gまたは他の種類の抗体を受動的吸着によって磁性粒子へ結合するためEDCを使用することなく同じ操作をくり返した。

#### 実施例 31

4mlバイアルへ、実施例29記載のように製造したウシ血清アルブミン被覆磁性粒子(4.3ミクロン、2%w/v)25mlを入れた。粒子を磁気分離し、リン酸緩衝液(0.1M, pH 5.5)で2mlへ再懸濁した。混合物へMs抗B赤血球表面抗原(20mg/ml)10μlと、そして1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カ

そしてアセトン、アセトニトリルおよびジメチルホルムアミドのような普通の有機溶媒に対して不活性であることがわかった。

#### 実施例 28

7.0%w/v 2.11ミクロンポリスチレン粒子20ml、実施例5記載のように製造した1.8%w/v金属酸化物100ml、脱イオン水50ml、およびスチレン6ml中過酸化ベンゾイル0.15g、ウンデシレニルアルコール0.75mlおよびジビニルベンゼン0.75mlを含む溶液を含有する混合物をシールしたびんへ入れた。びんを脱気し、そして55℃オーブン中で15時間約60rpmで回転した。混合物をチーズ布2層でろ過し、磁気分離し、上清が透明になるまで脱イオン水で数回洗った。得られた架橋したヒドロキシ磁性粒子をろ過し、乾燥し、金属酸化物含量約16.8%と平均3.9ミクロン寸法を有する粉末9gを得た。このようにして製造した架橋ヒドロキシ磁性粒子は寸法が均一であり、そしてアセトン、アセトニトリルおよびジメチルホルムアミドのような普通の有機溶媒に対して不活性であることがわかった。

#### 磁性粒子へ生物学的物質を結合

#### 実施例 29

80mlびんへ、実施例7記載のように製造した4.3ミクロン、5.0%w/vカルボキシル磁性粒子30mlを入れた。粒子を磁気分離し、そしてリン酸緩衝液50ml(0.1M, pH 5.5)中へ再懸濁した。この粒子懸濁液へウシ血清アルブミン20mgと、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)100mgを加えた。混合物を室温で2時間上下に回転し、そして磁気分離した。粒子をリン酸緩衝液で1回洗い、リン酸緩衝食塩水

ルボジイミド1mgを加えた。粒子を磁気分離し、リン酸緩衝液で1回洗い、リン酸緩衝食塩水(0.1M, pH 7.0)2ml中に再懸濁し、2.5%w/v懸濁液を得た。

#### 実施例 32

Ms抗A赤血球表面抗原(5mg/ml)40μlを使用し、2.5%w/v懸濁液2mlを得ることを除いて、実施例31に記載した同じ操作をくり返した。

#### 磁性粒子を使用する血液型判定

#### 実施例 33

Aと標識した5mm×65mm試験管中へ、実施例32記載のように製造した2.5%w/v Ms抗A被覆磁性粒子25μlを入れた。Bと標識した他の試験管中へ、実施例31に記載のように製造した2.5%w/v Ms抗B被覆磁性粒子25μlを入れた。両方の試験管へ等張緩衝食塩水のバックした赤血球の1対100倍希釈によって調製した1%バック赤血球50μlを加えた。試験管を指でつまんで数回振り、そして磁石の頂部へ置いた。結果は以下のように要約された。

	血 液 型			
	A	B	O	AB
チューブ A	+	-	-	+
チューブ B	-	+	-	+

ここで+は陽性反応を表し、試験管中の上清が磁気分離後透明である結果、赤血球が対応する抗体被覆磁性粒子によって凝集したことを意味する。他方、陰性反応の上清は赤血球と抗体被覆磁性粒子の間の凝集反応の不存在のため濁ったままであろう。



## 磁性粒子を用いるイムノアッセイ

## 実施例 34

2 滅ミクロン遠心チューブ中へ、6% w/v 3 ミクロンカルボキシル磁性粒子 1 滅を入れた。粒子を 10000 rpm において 3 分間遠心した。上清を吸引し、そして粒子を酢酸緩衝液中 5 ないし 1000  $\mu$ g/滅組換え HBcAg 1 滅と混合することによって再懸濁した。チューブを室温において 2 時間回転し、前記したように遠心した。上清を吸引し、粒子を酢酸緩衝液および正常動物血清 2 ないし 10% を含むオーバーコート溶液 1 滅中に再懸濁した。チューブを室温で 2 ないし 16 時間回転し、前記したように遠心した。上清を吸引し、粒子を遠心および再懸濁によって等張緩衝食塩水 (IBS) 1 滅で 3 回洗った。最後に粒子を IBS 1 滅で再懸濁し、2 ないし 8℃ で貯蔵した。

## 実施例 35

96 ウエルマイクロタイタープレートの最初の 2 カラムへ実施例 34 に記載したように調製した 0.25% w/v B 型肝炎コア抗原 (HBcAg) 被覆磁性粒子 20  $\mu$ l を入れた。サンプル調製物は陰性血清中 HBcAg 陽性血清の種々の希釈液を標本希釈緩衝液 (SDS) 中へ各サンプルを 1:100 希釈したものよりなっていた。SDS はリン酸緩衝液、タンパク安定剤、界面活性剤および抗微生物剤を含んでいた。粒子を含んでいるウエルへ、めいめいの最終サンプル希釈液 50  $\mu$ l を加えた。37℃ で 30 分間インキュベートした後、粒子を磁気分離機上で 2 分間分離し、そして塩類と洗剤を含んでいる洗浄緩衝液 200  $\mu$ l で 3 回洗った。粒子を含んでいる各ウエルへ、塩類、タンパク安定剤、グリセロール、洗剤および抗微生物剤

を含んでいる希釈液中ヤギ抗ヒト IgG- $\beta$ -D ガラクトシダーゼ複合体 (0.5  $\mu$ g/滅) 50  $\mu$ l を加えた。37℃ において 15 分間インキュベート後、粒子を分離し、前記のように 3 回洗い、IBS 30  $\mu$ l 中に再懸濁した。粒子を黒色マイクロタイタープレート (Dynatech) の最初の 2 カラムへ移した。粒子を含んでいる各ウエルへ 4-メチルウンベリフェリル- $\beta$ -ガラクトピラノシド (MUG, Sigma) を含んでいる溶液 100  $\mu$ l を加えた。プレートを 37℃ でインキュベートし、蛍光強度を 365 nm 励起および 450 nm 発光フィルターを備えた蛍光強度アナライザー (FCA, Penderex) を使用して 5 分間および 10 $\times$ ゲインセッティングで測定した。5 分間の蛍光強度の増加を任意蛍光単位 (AFU) で記録し、表 I に示した。

表 I

陽性標本の希釈度	AFU (5 分) 2 ウエルの平均
1:100	22687
1:1000	5933
1:5000	1516
1:8000	835
1:10000	639
1:15000	495
1:20000	427
1:25000	307

## 実施例 36

カルボキシル磁性粒子へのマウス抗 HBsAg の結合は実施例 3

0 と同様に行った。

黒色 96 ウエルマイクロタイタープレート (Dynatech) のウエルへ、0.25% w/v、3.2 ミクロン、マウス抗 HBsAg 被覆カルボキシル磁性粒子 20  $\mu$ l を 2 系列で加えた。磁性粒子を含んでいるウエルへ種々の量の HBsAg を含んでいる生の血清または HBsAg 陰性血清 100  $\mu$ l を加えた。37℃ において 30 分間インキュベート後、粒子を磁気分離機上で 2 分間分離し、塩類および洗剤を含んでいる洗浄緩衝液 100  $\mu$ l で 1 回洗った。粒子を含んでいる各ウエルへ、塩類、タンパク安定剤、グリセロール、洗剤および抗微生物剤を含んでいる希釈液中のマウス抗 HBsAg- $\beta$ -ガラクトシダーゼ複合体 20  $\mu$ l を加えた。37℃ において 15 分間インキュベート後、粒子を分離し前記のように 5 回洗った。粒子を含んでいる各ウエルへ、4-メチルウンベリフェリル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド (MUG, Sigma) を含んでいる溶液 50  $\mu$ l を加えた。プレートを 37℃ でインキュベートし、そして蛍光強度 365 nm 励起および 450 nm 発光フィルターを備えた蛍光強度アナライザー (FCA, Penderex) を使用して 5 分間および 10 $\times$ ゲインセッティングにおいて測定した。5 分間における蛍光強度の増加を任意蛍光単位 (AFU) で記録し、表 II に示した。

(以下余白)

表 II

HBsAg 濃度 (ナノ g)	AFU (5 分間) 2 ウエルの平均
1.0	1149
0.5	455
0.25	218
0.125	118
陰性	14

## 実施例 37

HTLV-III B/H-9 細胞 (Gallo 株) からの HIV-1 抗原を実施例 34 に記載したのと同様な操作を使用して 3.6 ミクロンカルボキシル磁性粒子へ結合した。

96 ウエルマイクロタイタープレートのウエルへ、0.25% w/v HIV 被覆磁性粒子の 20  $\mu$ l を 2 系列で加えた。粒子を含んでいるウエルへ、リン酸緩衝液、タンパク安定剤、洗剤および抗微生物剤を含んでいる標本希釈緩衝液 (SDS) 中に 1:100 に希釈した陽性、ボーダーラインおよび陰性標本 50  $\mu$ l を加えた。37℃ において 30 分間インキュベート後、粒子を磁気分離機上で 2 分間分離し、塩類および洗剤を含有する洗浄緩衝液 100  $\mu$ l で 3 回洗った。粒子を含んでいる各ウエルへ、塩類、タンパク安定剤、グリセロール、洗剤および抗微生物剤を含んでいる希釈液中のヤギ抗ヒト- $\beta$ -ガラクトシダーゼ (約 0.5  $\mu$ g/滅) 複合体 50  $\mu$ l を加えた。37℃ で 15 分間インキュベート後、粒子を前記のように 4 回洗った。粒子を黒色マイクロタイタープレートへ移した。粒子を含んでいる各ウエルへ、4-メチルウンベリフェリル- $\beta$ -D-ガ



ラクトビラノシド (MUC, Sigma) を含んでいる溶液 100  $\mu$ l を加えた。プレート を 37℃ でインキュベートし、そして 365 nm 励起および 450 nm 発光フィルターを備えた蛍光検出アナライザー (FCA, Pandex) を使用して 5 分間および 25  $\times$  ゲインセッティングにおいて測定した。5 分間における蛍光強度の増加を任意蛍光単位 (AFU) で記録し、表 III に示した。

表 III	
抗 HIV 標本	AFU (5 分) 2 ウェルの平均
陽性対照	9462
ボーダーライン標本	527
陰性対照	86

#### 磁性粒子を使用する細胞分離

##### 実施例 38

実施例 7 に記載したように製造した 4.3 ミクロンカルボキシル磁性粒子を洗浄し、リン酸緩衝食塩水 (PBS, pH 7.7) 中で超音波処理し、70% エタノール中 10 分間滅菌し、PBS で 3 回洗い、そしてアフィニティー精製したヒツジ抗マウス IgM グロブリン抗体 (SAM) と 0.5 mg/ml においてそして抗体 3.3 mg/粒子 100 mg の比で 4℃ で 48 時間インキュベートした。使用前抗体被覆磁性粒子は PBS 中で洗い、そして PBS 中に所望濃度に再懸濁した。

ヒト組織培養 CAL-10-陽性 NALM-16 白血病細胞を PBS 中で洗い、懸濁した。一方の分画は抗体で処理しなかった (-MoAb)。他方の分画は 4℃ で 2 種の抗 CD10 および 1 種の抗 C P9 モノクローナル抗体 (+MoAb) で 30 分間処理し、PBS

#### 特表平2-501753(11)

中で洗い、そして PBS 中  $3.5 \times 10^5$  細胞/ml へ調整した。一方は抗体処理細胞 (+MoAb)、他方は未処理細胞 (-MoAb) を含んでいる 2 本のチューブへ、SAM 被覆磁性粒子を粒子対出発細胞比 4.5 で加えた。チューブを 4℃ で 30 分間回転した。粒子を磁気分離機で分離した。上清を集め、残りの細胞を集めるために遠心した。ペレットをトリパンブルー 100  $\mu$ l 中に再懸濁し、総細胞カウントを行った。結果を表 IV に示す。

表 IV			
粒子/細胞比	細胞 + / - MoAb	受領した細胞	不足%
0	+	$7.62 \times 10^5$	0 (対照)
4.5	+	$2.89 \times 10^4$	96.2
4.5	-	$7.39 \times 10^5$	4.6

FIG. I

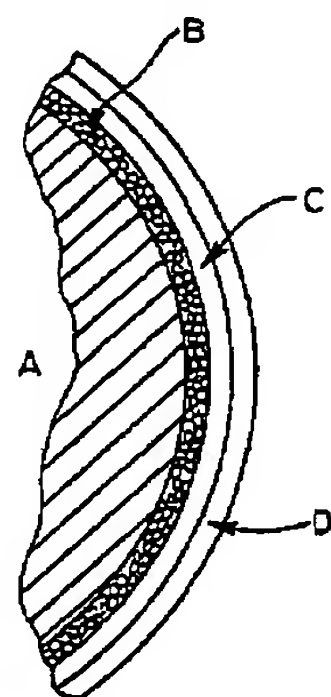


FIG. II

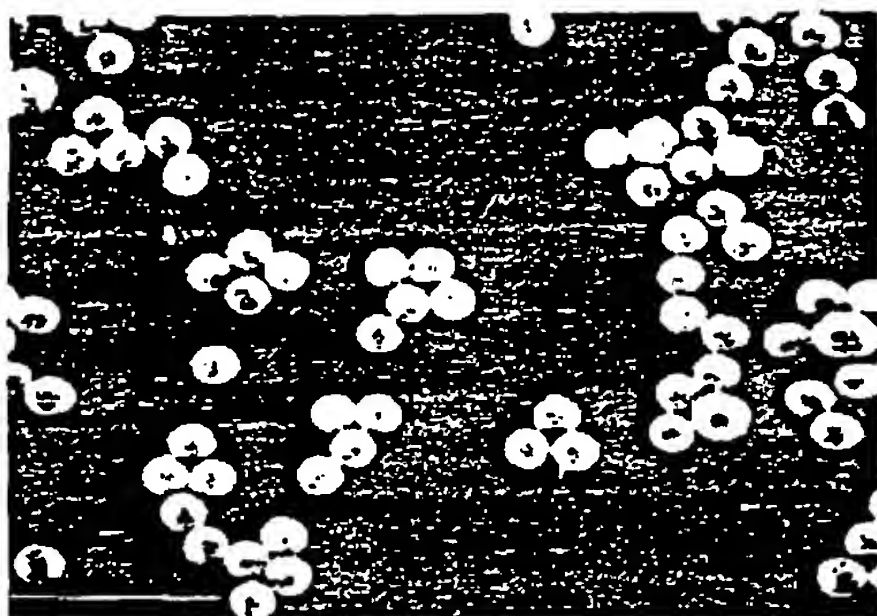


FIG. III a

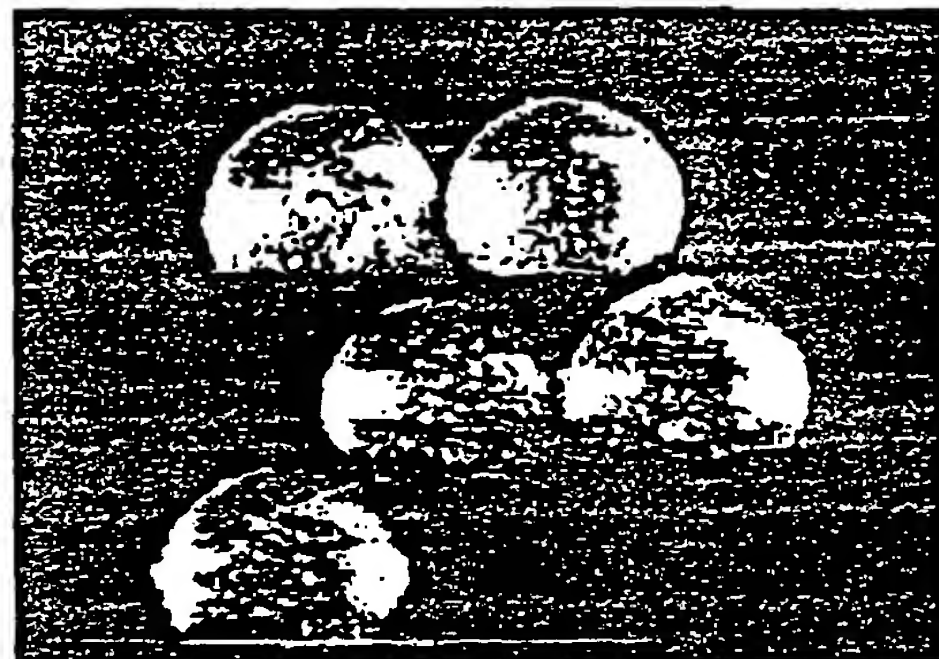


FIG. III b

國際調查報告

1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER OF COMMUNICATION (including, where appropriate, the name of the communication)	
IPC(4) C12G 1/62; G01N 33/533; C02F 1/48 D.S. CL. 252/62.51; 427/127; 436/526; 425/6; 210/695	
2. FIELDS SEARCHED	
Classification System: U.S. 210/695; 252/62.51, 62.53-62.56; 427/127-132, 212, 427/214, 216, 217, 221, 222, 338, 404, 405, 407, 2, 409, 436/526, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619, 620, 621, 622, 623, 624, 625, 626, 627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637, 638, 639, 640, 641, 642, 643, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 651, 652, 653, 654, 655, 656, 657, 658, 659, 660, 661, 662, 663, 664, 665, 666, 667, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713, 714, 715, 716, 717, 718, 719, 720, 721, 722, 723, 724, 725, 726, 727, 728, 729, 730, 731, 732, 733, 734, 735, 736, 737, 738, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 757, 758, 759, 760, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, 794, 795, 796, 797, 798, 799, 800, 801, 802, 803, 804, 805, 806, 807, 808, 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 816, 817, 818, 819, 820, 821, 822, 823, 824, 825, 826, 827, 828, 829, 830, 831, 832, 833, 834, 835, 836, 837, 838, 839, 840, 841, 842, 843, 844, 845, 846, 847, 848, 849, 850, 851, 852, 853, 854, 855, 856, 857, 858, 859, 860, 861, 862, 863, 864, 865, 866, 867, 868, 869, 870, 871, 872, 873, 874, 875, 876, 877, 878, 879, 880, 881, 882, 883, 884, 885, 886, 887, 888, 889, 890, 891, 892, 893, 894, 895, 896, 897, 898, 899, 900, 901, 902, 903, 904, 905, 906, 907, 908, 909, 910, 911, 912, 913, 914, 915, 916, 917, 918, 919, 920, 921, 922, 923, 924, 925, 926, 927, 928, 929, 930, 931, 932, 933, 934, 935, 936, 937, 938, 939, 940, 941, 942, 943, 944, 945, 946, 947, 948, 949, 950, 951, 952, 953, 954, 955, 956, 957, 958, 959, 960, 961, 962, 963, 964, 965, 966, 967, 968, 969, 970, 971, 972, 973, 974, 975, 976, 977, 978, 979, 980, 981, 982, 983, 984, 985, 986, 987, 988, 989, 990, 991, 992, 993, 994, 995, 996, 997, 998, 999, 1000	
3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Y	US, A. 3,860,378 (WEISS) 02 February 1971, see column 6, lines 31-35 and line 73 - column 7, line 33.
Y	US, A. 4,070,246 (KENNEDY) 24 January 1978, see column 2, lines 7-16, 29-32 and 51-57, column 3, lines 9-10, and 52-51.
Y	US, A. 4,177,253 (DAVIES) 04 December 1979, see Abstract, column 1, lines 32-33, column 2, lines 12-60, column 4, lines 19-45, column 5, lines 1-7 and 62-column 6, line 5, column 7, lines 57-59.
Y	US, A. 4,219,335 (EBERHOLT) 26 August 1980, see column 4, lines 5-17.
Y	US, A. 4,230,688 (SENTEI), 28 October 1980, see abstract, column 2, lines 32-60, column 3, lines 27-35.
4. SUMMARY	
27 February 1989	
14 APR 1989	
ISA/US	

H. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)	
Y	US, A. 4,272,510 (SMITH), 09 June 1981, see column 2, lines 50-65, and column 4, lines 29-44.
Y	US, A. 4,285,619 (YEN) 21 August 1981, see Abstract, column 1, lines 12-27, and column 4, line 64 - column 5, line 1.
Y	US, A. 4,382,982 (WHILLANS) 10 May 1983, see abstract, column 1, lines 45-85, column 3, lines 27-39, and 54-66, and column 4, lines 19-30.
Y	US, A. 4,490,436 (KAMAKANI) 25 December 1984, see Abstract column 1, lines 43-64, column 3, lines 20-27, and column 7, lines 59-62.
Y	US, A. 4,496,438 (KONDO) 29 January 1985, see column 2, lines 15-22, column 9, lines 46-65, and column 24, line 40 - column 25, line 8.
Y	WO, A. 85/05813 (HILL) 09 October 1986, see abstract.
Y	The Lancet I, No. 8368, issued 1984 January (London), J.G. Treleven, et al., "Removal of Neuroblastoma Cells From Marrow With Monoclonal Antibodies Conjugated To Magnetic Microspheres", pages 70-73, see Summary.

FURTHER INFORMATION CONTAINED FROM TWO SECOND SHEET	
<b>V. OBSERVERS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE?</b>	
This international search report has not been established in review of English claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:	
<input type="checkbox"/> <b>Claims obscure</b> . . . because they relate to subject matter it was intended to be searched by this Authority, namely:	
<input type="checkbox"/> <b>Claims obscure</b> . . . because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements in such an extent that no meaningful international search can be carried out on, satisfactorily	
<input type="checkbox"/> <b>Claims obscure</b> . . . because they are dependent claims not relating to inventions with the subject and vice versa of the PCT Rule 29.	
<b>VI. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING:</b>	
The international search report contains the following observations:	
I. Claims 1-5 drawn to a magnetic particles. Methods of making and a ligand binding method of using same; class 436/536.	
II. Claims 50-53 drawn to a hybridization assay; class 435/6.	
III. Claims 54-61 drawn to a method of isolating or purifying; class 210/695.	
<input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application.	
<b>Telephone Practice</b>	
<input type="checkbox"/> As only parts of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:	
<input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first claimed in the claims (1) is covered by claim (2)	
<input type="checkbox"/> As all search fees were paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application.	
<b>Remarks on Prior Art</b>	
<input type="checkbox"/> The additional search fees were not paid by the applicant.	
<input type="checkbox"/> No search fees were paid by the applicant.	

Telephone Approval:

\$ 180 payment approved by Susan B. Fantress on 27 January 1989 for additional Groups II and III, charge to Deposit Account No. 01-1440.

Counsel advised that she has no right to protest for any group not paid for and that any protest must be filed no later than 15 days from the date of mailing of the search report. (Form 210)

Reasons for holding lack of Unity of Invention:

The invention as defined in Group I (claims 1-49), drawn to magnetic particles, method making same, and method of using same to assay the concentration of an analyte as per immunoassay which is classified in class 436, subclass 526, is a materially different process of using said magnetic particles than the invention of Group II (claims 50-53) drawn to a nucleic acid hybridization assay method classified in class 435, subclass 6, or the invention of Group III (claims 54-61) drawn to methods of isolating or purifying a substance from a liquid classified in class 210, subclass 495.

### Time Limit For Filing A Process

Applicant is hereby given 15 days from the mailing date of this Search Report in which to file a protest of the holding of lack of unity of invention. In accordance with PCT Rule 40.2 applicant may protest the holding of lack of unity only with respect to the groups(s) paid for.

⑤ Int. Cl. <sup>8</sup>

C 12 Q 1/68  
G 01 N 33/545  
33/553

識別記号

厅内整理番号

A 6807-4 B  
A 7906-2 C  
7906-2 C